

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭62-55079

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑥ 公開 昭和62年(1987)3月10日

C 12 N 9/06

A 61 K 35/74

// C 12 Q 1/58

A-7236-4B

7138-4C

審査請求 有 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 修飾ウリカーゼ

⑯ 特 願 昭61-93855

⑰ 出 願 昭54(1979)4月5日

⑱ 特 願 昭54-41203の分割

⑲ 発 明 者 稲 田 祐 二 東京都大田区下丸子2丁目24番10号 多摩川ハイム1号棟  
808号

⑳ 出 願 人 美 浜 久 春 東京都世田谷区梅丘2丁目23番36号

明 細 書

1. 発明の名称

修飾ウリカーゼ

2. 特許請求の範囲

1. ウリカーゼ分子中のアミノ基が式



(ここに、Rは分子量2000以上の0-メトキシポリエチレングリコール残基を示す。)を有する基で部分的に置換された抗原性を低下又は消失させた修飾ウリカーゼ。

3. 発明の詳細な説明

本発明は抗原性を低下又は消失させた修飾ウリカーゼに関し、医薬としての安全性を高めたものである。

ウリカーゼは分子量約12万で、4個のサブユニットよりなる酵素蛋白質であり、尿酸をアラントインと過酸化水素と炭酸ガスに分解する

反応を触媒する蛋白質である。ヒト及び霊長類ではウリカーゼ活性が低く、尿酸がプリン代謝の主な最終産物であると考えられているが、高尿酸血症の患者においては、組織および血液中に多量に尿酸が蓄積され極度の疼痛を覚える。現在その治療が強く望まれているのに根本的な治療法は確立されていない。

現在ウリカーゼは肝臓及び酵母より単離精製され、臨床検査用として尿酸の定量に使用されている。この酵素を直接血液中に投与し、血中の尿酸を分解することによって痛風を治療しようとする考えは、そのウリカーゼがヒト以外の動物より単離されたものであるがため、ヒトにとって異種の蛋白質であるので抗体を産生し、再度のウリカーゼの投与によつてアナフィラキシー・ショックを起し死に至らしめる。その原因はウリカーゼ分子の表面にはヒトにとつて非自己と認識される抗原決定部位が存在するためであり、その部位は2〜3個のアミノ酸残基によつて構成されていると考えられる。ウリカー

ゼの抗原性の低下あるいは消失は、ヒトにとって非自己を自己に変換し、痛風患者（高尿酸血症）への再投与を可能にする。

本発明者は、先にウリカーゼ分子中に存在するアミノ酸残基を、  
式

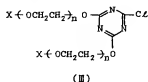
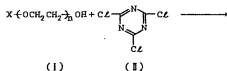


（ここに、Rは分子量2000以上の0-メトキシポリエチレングリコール残基を示す）を有する基（活性PEO<sub>1</sub>）で部分的に置換することによつて、酵素活性を保持しながら抗原性を著しく低下又は消失させることができることを見出し、特許出願した（特開昭55-99189参照）。

これら先の発明においては、ウリカーゼの表面をヒゲ状の高分子残基で覆うことによつて、抗原抗体反応を阻止するものであつて、酵素活

性を有する基（活性PEO<sub>2</sub>）で部分的に置換された抗原性を低下又は消失させた修飾ウリカーゼである。

本発明の修飾ウリカーゼの製法の1例を示す。  
分子量2000以上の0-メトキシポリエチレングリコール（I）と2,4,6-トリクロル-8-トリアジン（II）とを反応させることによつて、2,4-ビス（0-メトキシポリエチレングリコール）-6-クロル-8-トリアジン（III）が製造される。



性を保持したまま、抗原性を消失させることに特徴がある。しかしながら、抗原性を消失させるためには酵素活性も又かなり低下する欠点があつたため、なお改良する必要があつた。

本発明者は研究の結果、2本鎖の水溶性高分子残基を有するトリアジンをウリカーゼに反応させることによつて、1本鎖の水溶性高分子残基を有するトリアジンを同酵素に反応させた場合に比べ同酵素のアミノ酸残基の修飾数を減らすことができ、また酵素表面を水溶性高分子で覆う効果が増加すると共に、酵素活性の低下を抑制することに成功した。

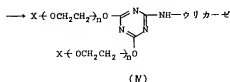
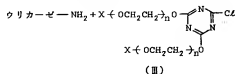
即ち、本発明はウリカーゼ分子中のアミノ基が  
式



（ここに、Rは分子量2000以上の0-メトキシポリエチレングリコール残基を示す）

（Xはメチル基を示す）反応は塩基の存在下還流温度で行なわれる。

次にpH10に保つたウリカーゼ溶液に、2,4-ビス（0-メトキシポリエチレングリコール）-6-クロル-8-トリアジン（III）をウリカーゼ分子中に存在するアミノ基当り1.5～1.5倍量（モル比）を蛋白質の実性を起こさない条件下で反応させることによつて、ウリカーゼ分子中のアミノ基が部分的に置換された本発明修飾ウリカーゼ（N）が得られる。



本発明の修飾ウリカーゼは、その分子量を測定すると、ウリカーゼの分子量12万と結合した化合物(Ⅱ)の分子量の合計に一致していることにより確認される。

本発明の修飾ウリカーゼについて、前記化合物(Ⅱ)の付加率は、未反応のアミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸を用いて測定する方法により行い、ウリカーゼ分子中の結合したアミノ基の数を測定した。酵素活性は尿酸の酸化に原因する293nmでの吸光度の減少を測定する方法で調べた。293nmでの尿酸の分子吸光係数は $1.26 \times 10^4$ リットル/モル/cmであつた。抗原性の測定は、ウサギをウリカーゼで免疫した抗血清を用い、抗原-抗体反応により生ずる沈降量を測定する方法により行い、抗体との結合能を測定した。

実施例の方法により製造された本発明の修飾ウリカーゼについて、酵素活性及び抗体との結合能を測定した結果は次表のとおりである。

| PEG<br>(MW) | 活性PEG <sub>2</sub><br>の濃度(g/g) | 結合した<br>アミノ基の数 | 酵素活性<br>% | 抗体との<br>結合能% |
|-------------|--------------------------------|----------------|-----------|--------------|
| —           | 0                              | 0              | 100       | 100          |
| 5000        | 50                             | 22             | 87        | 86           |
| #           | 100                            | 25             | 70        | 49           |
| #           | 150                            | —              | 63        | 6            |
| #           | 250                            | 36             | 45        | 0            |
| #           | 350                            | 46             | 31        | 0            |
| 5000        | 活性PEG <sub>1</sub><br>60       | 43             | 15        | 0            |

表から総アミノ基98のうち36が活性PEG<sub>2</sub>で修飾されたウリカーゼは、結合能が完全になくなっているが、なお45%の酵素活性が残存した。一方活性PEG<sub>1</sub>で修飾したものは15%の酵素活性しか残存しなかつた。

#### 参考例

10gの無水炭酸ソーダを含む100mlの無水ベンゼンに分子量5000のモノメトキシポリエチレングリコール20gを溶解し、80℃で30分間煮沸した後、2,4,6-トリクロル-8

-トリアジン365mgを加え、1昼夜80℃で濃縮下反応させた。反応残留物を除去し、石油エーテル300mlを加えて沈降を生じしめ、沈降を数回石油エーテルで洗い、2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-タロル-8-トリアジンを製造した。

#### 実施例

ウリカーゼ5mgを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH10)に、上記により製造した2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-タロル-8-トリアジンをウリカーゼ分子中のアミノ基に対し10倍モル比加へ、37℃で1時間反応させた。常法により精製し、白色粉末の修飾ウリカーゼを得た。このものの分子量は45万であり、アミノ基の分析の結果30個が結合していたので付加部分の分子量 $30 \times 5000 \times 2 = 300000$ とウリカーゼの分子量12万との合計(42万)とほぼ一致した。